



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 28 894 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/62
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/70
G 01 N 33/68

②1 Aktenzeichen: 196 28 894.0
②2 Anmeldetag: 17. 7. 96
④3 Offenlegungstag: 22. 1. 98

DE 196 28 894 A 1

⑦1 Anmelder:
Hagenmaier, Hanspaul, Prof. Dr., 72072 Tübingen, DE
⑦4 Vertreter:
Kinzebach und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:
Hagenmaier, Susanne, Dr., 72072 Tübingen, DE;
Hagenmaier, Hanspaul, Prof. Dr., 72072 Tübingen,
DE; Schrenk, Dieter, Dr. Dr., 72074 Tübingen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤4 Verfahren zum Nachweis für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen
- ⑤7 Die Erfindung betrifft ein genetisches Verfahren zum Nachweis von Effektoren von protein-Protein-Wechselwirkungen, Verfahren zur Isolierung neuer Effektoren, Nukleinsäure-Sequenzen, welche für die im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren verwendeten Hybridproteine kodieren, sowie einen Analysenkit zur Durchführung des Nachweisverfahrens.

DE 196 28 894 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 97 702 064/261

26/25

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein genetisches Nachweisverfahren für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es ist insbesondere anwendbar im Rahmen des sogenannten Belastungs-
 5 Screenings für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen. Das erfindungsge-
 mäße Nachweisverfahren ist auch einsetzbar bei der Suche nach und Isolierung von unbekannten Effektoren
 bereits bekannter intra- und/oder interzellulärer Wechselwirkungen auf Proteinebene. Gegenstand der Erfin-
 dung sind außerdem Nukleinsäuresequenzen und Analysen-Kits, welche zur Durchführung des erfindungsge-
 mäßen Nachweisverfahrens benötigt werden.

10 Aus dem Stand der Technik ist seit langem bekannt, daß Protein-Protein-Wechselwirkungen und die dabei
 gebildeten stabilen oder transienten Proteinkomplexe von entscheidender Bedeutung in der gesamten Biosphä-
 re sind. Entstehung, Entwicklung und Reproduktion von Organismen der unterschiedlichsten Entwicklungsstu-
 fen wäre ohne Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht denkbar. Protein-Protein-Wechselwirkungen stellen in
 biochemischen Prozessen, wie DNA-Replikation, -Transkription und -Translation, sekretorischen Vorgängen,
 15 Signaltransduktion, Zellstoffwechsel und Zellzyklus, zentrale Schnitte dar.

Diese Schlüsselfunktion von Protein-Protein-Wechselwirkungen bringt es mit sich, daß Effektoren, welche,
 meist hoch spezifisch, eine bestimmte Wechselwirkung fördern oder inhibieren, einen wesentlichen Einfluß auf
 den betreffenden Organismus auszuüben vermögen.

Die Beeinflussbarkeit von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Effektoren kann z. B. anhand des Cytos-
 20 keletts eukaryotischer Zellen erläutert werden. Das Cytoskelett trägt nicht nur zur Stabilität eukaryotischer
 Zellen bei, sondern übernimmt auch andere wichtige Funktionen, wie den Transport von Vesikeln, Veränderun-
 gen der Zellform sowie die Bewegung von Zellen. Diese dynamische Struktur wird durch drei Klassen filamentö-
 ser Zusammenlagerungen gebildet: den Mikrofilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli.
 Mikrofilamente werden durch Polymerisation eines Proteins, des sogenannten Aktins gebildet. Die für die
 25 Polymerisation erforderliche Protein-Protein-Wechselwirkung von Aktinproteinen kann beispielsweise durch
 das Pilz-Alkaloid Cytochalasin B inhibiert werden. Cytochalasin stört den Zusammenbau der Aktinfilamente
 durch die Bindung (Capping) an das für die weitere Polymerisation wichtige freie Ende des letzten Aktinproteins.

Ein Verständnis des Zusammenspiels der an einer Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligten Protein-Fak-
 30 toren einerseits und der positiven oder negativen Effektoren andererseits ermöglicht die Nutzung dieser
 Erkenntnis in verschiedener Hinsicht. Versteht man nämlich, wie eine Protein-Protein-Wechselwirkung unter
 normalen Umständen, das heißt physiologisch verläuft, oder hat man physiologische Effektoren der Wechselwir-
 kung analysiert, so besteht die Möglichkeit, diese Wechselwirkung gezielt zu manipulieren. Diese Manipulation
 kann darin bestehen, bekannte Effektoren durch gezielt modifizierte Effektoren zu ersetzen oder erstmals
 Effektoren für eine bekannte Protein-Protein-Wechselwirkung bereitzustellen. Darüber hinaus eröffnet ein
 35 Verständnis der Protein-Protein-Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen die Möglichkeit, Stö-
 rungen des Organismus durch äußere Einflüsse zu verstehen und diesen gegebenenfalls vorzubeugen.

Eine Umsetzung der grundlegenden Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Proteinen auf zellulärer
 Ebene in praktischen Nutzen wird bisher dadurch behindert, daß die damit verbundenen Untersuchungen hohen
 zeitlichen und/oder experimentellen Aufwand erfordern. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Notwendigkeit
 40 besteht, Effektoren einer bekannten Protein-Protein-Wechselwirkung nachzuweisen. Handelt es sich beispiels-
 weise um künstlich erzeugte Effektoren, wie zum Beispiel Umweltschadstoffe, welche bereits in geringsten
 Mengen eine physiologische Protein-Protein-Wechselwirkung beeinflussen und in der Folge einen Organismus
 schädigen können, besteht hierbei das Problem, den künstlichen Effektor zunächst einmal um mehrere Zehner-
 potenzen anzureichern, um ihn dann chromatographisch, spektrometrisch oder enzymatisch nachweisen zu
 45 können. Ein klassisches Beispiel für einen derartigen Effektoren stellt Dioxin, das heißt 2,3,7,8-Tetrachlordiben-
 zo-p-dioxin (TCDD) dar. Es ist mittlerweile bekannt, daß TCDD und andere Dioxine auf molekularer Ebene
 wirksame Induktoren der Transkription einer Reihe von Target-Genen darstellen, die für metabolische Enzyme,
 wie zum Beispiel Glutathion-S-Transferase Ya, Aldehyd-Dehydrogenase und Chinon-Oxidoreduktase kodieren
 (Landers, J.P. und Bunce, N. J. (1991) Biochem. J. 276, 273 bis 287). Mittlerweile ist auch bekannt, daß diese
 50 Dioxineffekte über den sogenannten intrazellulären Dioxinrezeptor, den sogenannten Ah (Arylhydrocar-
 bon)-Rezeptor verlaufen. Es wurde festgestellt, daß dieser Rezeptor unter dem Einfluß von Dioxin an einen
 zweiten Proteinfaktor, das sogenannte Arnt-Protein bindet. Der auf diese Weise gebildete Komplex gelangt
 dann in den Zellkern, bindet an die Target-DNA und induziert auf diese Weise die oben beschriebene Transkrip-
 tion verschiedener weiterer biologischer Faktoren (vgl. Whitelaw, M. et al. (1993) Molecular and Cellular
 55 Biology, 2504 bis 2514; Mason, G.G.F., et al. (1994), J. Biol. Chem. Band 269, Nr. 6, 4438 bis 4449). Gerade auf dem
 Gebiet der Untersuchung von Umweltschadstoffen besteht ein großer Bedarf an geeigneten Screening-Metho-
 den, um im Rahmen von dringend erforderlichen epidemiologischen Studien die Umweltbelastung, an weit
 größeren Populationen als bisher, im Rahmen eines sogenannten Belastungs-Screenings durchführen zu können.

Die potentielle Nutzbarkeit von Erkenntnissen über Effektoren spezieller Protein-Protein-Wechselwirkungen
 60 kann anhand einiger Beispiele aus dem Gebiet der Virologie weiter veranschaulicht werden. Viren sind bekannt-
 lich Krankheitserreger für Mensch, Tier und Pflanzen. Sie können relativ harmlose Erkrankungen, wie Erkältun-
 gen, aber auch lebensbedrohliche Krankheiten, wie Polyo oder AIDS, verursachen. Ein Virus ist ein intrazellulä-
 rer Parasit, der innerhalb und außerhalb einer Zelle in zwei fundamental unterschiedlichen Formen existieren
 kann. Die extrazelluläre Form wird Virion oder Viruspartikel genannt. Virione bestehen aus dem viralen Genom,
 65 welches mit Proteinen und zuweilen auch mit anderen chemischen Substanzen, wie Lipiden, assoziiert ist. Die
 Proteine schützen das Genom vor Zerstörung im extrazellulärem Raum, ermöglichen den Eintritt in die Wirts-
 zelle und üben oftmals einleitende Schritte beim viralen Replikationszyklus aus. Während der Infektion wird die
 Virionstruktur größtenteils oder komplett zerstört, so daß das Genom in der Zelle frei zur Transkription und

Replikation vorliegt.

Auf den ersten Blick erscheinen Virione von tierischen Viren eine hohe Variabilität zu besitzen. Bei näherer Betrachtung sind jedoch wesentliche Gemeinsamkeiten erkennbar. Der Teil des Viruspartikels, welcher von Virus-kodierenden Proteinen aufgebaut wird, das Capsid, muß aus einem oder wenigen verschiedenen, sich wiederholenden Proteinbausteinen aufgebaut sein. Diese Beschränkung ist dem Virus durch die limitierte Größe seines Genoms vorgegeben und führt dazu, daß die Virion-Capside einen Grundbauplan mit folgenden zwei Eigenschaften besitzen: a) eine enge Helix undefinierter Länge mit dem Genom im Zentrum und b) eine quasi-sphärische ikosaedrische Struktur. Virione tierischer Viren können sich durch An- bzw. Abwesenheit eines äußeren Membranmantels zusätzlich unterscheiden. Virione, welche diese Membranhülle nicht besitzen, werden als "nackt" bezeichnet. Viren, die diesen, auch Envelope genannten, Membranmantel aufweisen, erwerben diesen aus der Membran des Wirts über einen 2-Schritt-Prozeß, der "budding" genannt wird. Zunächst werden virale Glykoproteine in die Membran inseriert, welche durch Wechselwirkung mit Capsid-Proteinen das Capsid mit der Membran umhüllen und das nun fertige Viruspartikel nach außen freisetzen.

Es zeigt sich also, daß bei viralen Prozessen Protein-Protein-Wechselwirkungen eine entscheidende Funktion besitzen: Es assoziieren Capsid-Proteine unter gegenseitiger Wechselwirkung zum Capsid; während des "budding"-Prozesses wechselwirken virale Glykoproteine aus der Membran der infizierten Zelle mit viralen Capsidproteinen; Virion-Proteine wechselwirken mit Zelloberflächenantigenen der zu infizierenden Wirtszelle.

Dieses Wissen über zentrale Schlüsselereignisse könnten dazu dienen, Viren auf eben dieser Basis zu bekämpfen, indem man nämlich diese wichtigen Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Inhibitoren gezielt unterbindet. Die modernen Methoden der Molekularbiologie machten es möglich, die cDNA- bzw. Proteinsequenz viraler Proteine aufzuklären. Bisher fehlt es jedoch an geeigneten Testverfahren, um systematisch und mit vertretbarem experimentellem Aufwand nach geeigneten Effektoren dieser viralen Protein-Protein-Wechselwirkungen suchen zu können. Ein schnelles, nachweisempfindliches in-vivo-Screeningverfahren, für diesen Zweck wäre äußerst wünschenswert.

Aus dem Stand der Technik ist seit einigen Jahren die sogenannte Two-Hybrid-Technik bekannt, welche auf Arbeiten von Fields, S. und Song, O., veröffentlicht in Nature (1989), 340, S. 245 bis 246, zurückgeht. Die Two-Hybrid-Technik wurde entwickelt, um Wechselwirkungen zwischen bekannten Proteinen besser untersuchen zu können oder um bisher unbekannte Proteine zu identifizieren, welche mit einem bestimmten bekannten Protein in Wechselwirkung treten.

Die Two-Hybrid-Technik ist eine genetische Methode, mit welcher eine Protein-Protein-Wechselwirkung über die transkriptionale Aktivität eines in Zellkultur produzierten Hybridprotein-Komplexes bestimmt wird. Die Technik beruht auf dem modularen Aufbau vieler ortsspezifischer Transkriptionsfaktoren (Transkriptionsaktivatoren), bestehend aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne. Die Two-Hybrid-Technik basiert auf der Beobachtung, daß eine direkte kovalente Verbindung zwischen diesen beiden Domänen nicht erforderlich ist, sondern daß eine räumliche Nähe, bewirkt durch Wechselwirkung zweier beliebiger anderer Proteine, ausreicht, um Transkription zu induzieren.

Zur Durchführung des Verfahrens ist es erforderlich, zwei Hybridproteine zu konstruieren und diese in einem geeigneten Wirtszellsystem, wie z. B. in Hefezellen, gemeinsam zu exprimieren. Eine Sequenz, die für ein erstes an einer Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligten Protein kodiert, wird unter Beibehaltung des Leserahmens mit der kodierenden Sequenz der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors, wie z. B. des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4, fusioniert, wobei man die kodierende Sequenz für ein erstes Hybridprotein erhält. Die kodierende Sequenz für ein zweites Hybridprotein stellt man her, indem man die kodierende Sequenz für das zweite an der Wechselwirkung beteiligte Protein mit der kodierenden Sequenz für die Aktivator-Domäne des Transkriptionsfaktors im gleichen Leserahmen fusioniert. Ein funktionaler Aktivator wird nach Co-Expression in dem Wirtssystem erzeugt, wenn DNA-Bindungsdomäne und Aktivierungs-Domäne aufgrund der physikalischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Fremd-Proteinkomponenten miteinander in räumliche Nähe treten. Ist dies der Fall, so wird ein Reportergen exprimiert, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Aktivierungssequenz, wie zum Beispiel GAL1 UAS steht, an welche die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors bindet. Die durch die Wechselwirkung der beiden Fremdproteine bedingte Rekonstitution der Funktion des Transkriptionsfaktors bewirkt somit die Transkription des Reportergens (wie zum Beispiel lac Z oder HIS 3). Dessen Genprodukt, wie zum Beispiel β -Galactosidase, kann dann in herkömmlicher Weise nachgewiesen werden.

Die eben beschriebene Two-Hybrid-Technik wurde bisher ausschließlich bei der Identifizierung und Untersuchung verschiedener Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgreich eingesetzt. Staudinger et al. beschreiben in J. Biol. Chem. (1993), Bd. 268, S. 4608 bis 4611 die Verwendung der GAL4-Two-Hybrid-Technik zum Screening auf neue Zelltyp-spezifische Bindungspartner für das Helix-Loop-Helix (HLH)-Protein E12. Vojtek, A.B. et al. beschreiben in Cell (1993), Bd. 74, S. 205 bis 214 die Identifikation neuer, mit H-Ras wechselwirkenden Proteinen unter Verwendung der Two-Hybrid-Technik, wobei eine Maus-cDNA-Genbank gescreent wurde. Yang, X., et al. schlagen in Science (1992), Bd. 257, S. 680 bis 682 die Verwendung der Two-Hybrid-Technik zum Nachweis physikalischer Wechselwirkungen zwischen Protein-Kinasen und funktionell verwandten Substrat-Proteinen vor. Li, B. und Fields, S. berichten in The FASEB Journal (1993) Bd. 7, S. 957 bis 963 über Untersuchungen des Einflusses von Mutationen im Tumorsuppressor-Protein p53 auf dessen Wechselwirkung mit dem T-Antigen, einem viralen Oncogenprodukt aus SV 40. Chardin, P. et al. berichten in Science (1993), Bd. 260, S. 1338 bis 1343 über die Verwendung der Two-Hybrid-Technik zum Nachweis der Wechselwirkung des Proteins hSos1 mit dem Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenen Protein 2 (GRB2). Hardy, C. F. J. et al. beschreiben in J. Biol. Chem. (1992) Bd. 267, S. 801 bis 814 eine Mutante des Proteins RIF 1, welche mit einer Mutante des Sequenz-spezifischen DNA-Bindungsprot. ins RAP 1 wechselwirkt. Der oben beschriebene Stand der Technik benutzt somit die Two-Hybrid-Technik ausschließlich in der von Fields und Song bereits 1989 vorgeschlagenen Art und Weise,

nämlich zum Screening einer DNA-Genbank um neue Protein-Bindungspartner eines bereits bekannten Proteins ausfindig zu machen, und um bekannte Protein-Protein-Bindung näher zu charakterisieren.

Als weitere Anwendungsmöglichkeit wurde von Fiels und Song (1989, a.a.O.) die Anwendung der Two-Hybrid-Technik im Rahmen des Designs therapeutisch wirksamer Peptide vorgeschlagen, die mit Proteinen bakteriellen oder viralen Ursprungs wechselwirken. Ausführungsbeispiele zu ihren Vorschlag liefern die Autoren jedoch nicht.

Eine gewisse Erweiterung des klassischen Anwendungsgebietes der Two-Hybrid-Technik stellen die Arbeiten von Luban et al. sowie von Chiu et al. dar. Luban, J. et al. beschreiben in Cell, (1993) Bd. 73, S. 1068 bis 1078 die Verwendung des GAL4-Two-Hybrid-Systems zum Screening einer cDNA-Bank und die Identifikation von Cyclophilin A und B als Proteine, die mit dem Gag Polypeptid Pr55^{gag} aus HIV-1 wechselwirken. Es wurde weiterhin festgestellt, daß die Gag-Cyclophilin A Wechselwirkung durch Cyclosporin A unterbunden werden kann, wobei jedoch bereits aus früheren Arbeiten bekannt war, daß Cyclosporin A an Cyclophiline bindet.

Chiu, M.I. et al. beschreiben in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), Bd. 91, S. 12574 bis 12578 die Suche nach einem Bindungsprotein, das mit dem FKBP12/Rapamycin-Komplex wechselwirkt. Rapamycin ist ein bekanntes Immunsuppressivum, das mit seinem Rezeptorprotein FKBP12 einen Komplex bildet, der, wie von Chiu et al. festgestellt, an ein weiteres bis dahin nicht bekanntes Protein, nämlich RAPT 1 bindet. Die Arbeiten von Luban et al. bzw. Chiu et al. haben somit gezeigt, daß die Two-Hybrid-Technik auch zum Nachweis solcher Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden kann, welche in Gegenwart eines bekannten niedermolekularen Liganden unterbunden werden (wie z. B. im Falle von Cyclosporin A) oder erst in Gegenwart des Liganden beobachtet werden können (wie im Falle von Rapamycin). Beiden Arbeiten gemeinsam ist jedoch die Suche nach einem bisher nicht bekannten Protein-Bindungspartner. Ohne konkrete Beispiele zu liefern, spekulieren Chiu et al. daß die Two-Hybrid-Technik für Tests mit und das Design von niedermolekularen Modulatoren einer Protein-Protein-Wechselwirkung eingesetzt werden könnte, wobei die untersuchten Modulatoren potentiellen therapeutischen Wert besitzen sollten. Voraussetzung für solche Untersuchungen wäre jedoch, den zu testenden Modulator in isolierter Form, d. h. als Reinsubstanz und vor allem in ausreichender Menge, zur Verfügung zu haben, um ihn dann zur Untersuchung seines Einflusses auf die Protein-Protein-Wechselwirkung im Test einsetzen zu können.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, daß der diskutierte Stand der Technik keinerlei brauchbare Hinweise enthält, daß die Two-Hybrid-Technik erfolgreich bei der Suche nach niedermolekularen, bekannten oder unbekannten, Effektoren definierter Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden kann. Insbesondere gibt es keinen Hinweis im Stand der Technik, die Two-Hybrid-Technik im Rahmen echter Screeningverfahren für niedermolekulare Effektoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen einzusetzen. Screeningverfahren sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, daß der potentielle Effektor nicht als Reinsubstanz sondern im Gemisch mit anderen Verbindungen und in äußerst geringer Konzentration vorliegt. Dies ist insbesondere der Fall, wenn man neue Ressourcen auf unbekannte Effektoren hin untersucht oder in identischer Weise gewonnene Proben gleichen Typs auf einen bekannten Effektor screenet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist somit die Bereitstellung eines Nachweisverfahrens für niedermolekulare Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dessen Hilfe insbesondere Substanzgemische schnell und mit hoher Nachweisempfindlichkeit auf das Vorhandensein eines bekannten oder unbekannten Effektors für ein vorgegebenes Protein-Protein-Wechselwirkungssystem untersucht werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren soll insbesondere anwendbar sein für sogenannte Belastungsscreeningverfahren, die im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen eingesetzt werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren soll außerdem geeignet sein zur Durchführung sogenannter Naturstoffscreeningverfahren, um neuartige therapeutische Wirksubstanzen lokalisieren und anschließend analysieren zu können.

Überraschenderweise gelöst wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch Bereitstellung eines genetischen Nachweisverfahrens für Effektoren intra- und/oder intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man

a) in einer Wirtszelle in Gegenwart eines Analyten, in dem man die Effektorfunktion vermutet, zwei Polypeptid-Hybride A₁A₂ und B₁B₂ exprimiert, deren Domänen A₁ und B₁ zusammen einen funktionellen Transkriptions-Aktivator-Komplex bilden, wenn die Domänen A₂ und B₂, welche die intra- und/oder interzelluläre Wechselwirkung, so wie sie beispielsweise unter physiologischen Bedingungen abläuft, imitieren, miteinander wechselwirken, wobei die Wechselwirkung zwischen den Polypeptiddomänen A₂ und B₂ nur bei Fehlen oder Vorliegen der Effektorfunktion, d. h. wenigstens eines Effektors, in dem Analyten zu beobachten ist; und

b) auf Expression eines Reporter-Gens analysiert, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche der (in situ gebildete) Transkriptions-Aktivator-Komplex bindet, wobei Expression des Reporter-gen-Produkts auf Vorliegen oder Fehlen der Effektorfunktion im Analyten hinweist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung der auf diese Weise nachgewiesenen Effektoren sowie die unter Anwendung dieses Verfahrens isolierten neuen Effektoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Nukl. insäuresequenzen, welche für die im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren verwendete Hybridprotein oder Polypeptidhybride A₁A₂ und B₁B₂ kodieren.

Schließlich ist Gegenstand der Erfindung ein Analysenkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1 zeigt das Konstruktionsschema zweier erfindungsgemäß anwendbarer Expressionsvektoren vor Insertion der kodierenden Sequenz für die zweite Hybridprotein-Komponente: (A) zeigt das 5523 bp Plasmid pGBT9, das die kodierende Sequenz für die DNA-Bindungsdomäne (bd) des eukaryotischen Transkriptionsaktivators GAL4 enthält. (B) zeigt das 6659 bp Plasmid pGAD424, das die kodierende Sequenz für die Transkriptions-Aktivierungsdomäne (ad) von GAL4 enthält. In den Fig. 1(A) und 1(B) steht "MSC" für die Multiple Klonierungsstelle, "p" für die Promotor, "T" für die Transkriptions-Terminationssequenz und "▲" für das SV40 Kernlokalisierungssignal.

Fig. 2 zeigt das Konstruktionsschema der Expressionsvektoren von Fig. 1 nach Insertion der kodierenden Sequenz für die zweite Hybridprotein-Komponente: (A) veranschaulicht die Insertion der kodierenden Sequenz für das ARNT-Protein in die BamHI-Schnittstelle der MSC von pGBT9. (B) zeigt die Insertion der kodierenden Sequenz für das Ah-Protein in die Sall Schnittstelle der MSC von pGAD424.

Die Erfindung wird in den nun folgenden Abschnitten näher erläutert.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren bietet den überraschenden Vorteil, daß Effektoren einer vorgegebenen Protein-Protein-Wechselwirkung in effizienter Weise, das heißt schnell und, in der Regel ohne Abtrennung der in dem untersuchten Analyten vorhandenen weiteren nieder- oder hochmolekularen Komponenten qualitativ erfaßt werden können. Eine Auftrennung des Analyten bzw. eine weitere Eingrenzung des Effektors ist nur dann angesagt, wenn sich zeigen sollte, daß mehr als ein Effektor der betreffenden Protein-Protein-Wechselwirkung in dem Analyten enthalten ist oder einzelne Komponenten der Analyten das Testsystem stören. Letzteres kann der Fachmann durch wenige Kontrollversuche leicht feststellen.

Die im erfindungsgemäßen Testsystem künstlich induzierte Protein-Protein-Wechselwirkung "imitiert" die natürliche, bzw. physiologische Wechselwirkung insofern, als zumindest die Bindungsspezifität der wechselwirkenden Proteinkomponenten im wesentlichen erhalten bleibt. Die Stärke der Wechselwirkung im Testsystem kann im Vergleich zum physiologischen Prozeß variieren.

Die gemäß vorliegender Erfindung vorgegebene Protein-Protein-Wechselwirkung ist natürlich nicht beschränkt auf reine Proteine oder Polypeptide. Die Erfindung ist ebenfalls anwendbar auf solche Wechselwirkungen, an denen z. B. Glykoproteine oder Lipoproteine beteiligt sind. Erfindungsgemäß brauchbare Testsysteme sind außerdem nicht nur mit vollständigen Proteinen als Bindungspartner etablierbar. Vielmehr sind auch funktionale Äquivalente von an der nativen Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligten Faktoren brauchbar. Solche funktionalen Fragmente können Teilsequenzen, wie z. B. bestimmte Domänen, des Faktors umfassen, auf welche die zur Wechselwirkung benötigte Bindungsfunktion lokalisiert ist. Geeignete Fragmente können z. B. gentechnisch oder in klassischer Weise durch enzymatische oder chemische Fragmentierung erzeugt werden. Erfindungsgemäße funktionelle Äquivalente umfassen außerdem durch Aminosäure-Substitution, -Addition und/oder -Deletion unter Beibehaltung der Bindungsspezifität, z. B. gentechnisch, erzeugte Derivate der Bindungspartner.

Der nachzuweisende Effektor ist vorzugsweise eine niedermolekulare Komponente, welche die Protein-Protein-Wechselwirkung stimuliert oder inhibiert. Es kann sich also um einen positiven oder negativen Effektor der Wechselwirkung handeln.

Die vorgegebene intra- und/oder interzelluläre Protein-Protein-Wechselwirkung ist ein Vorgang, der unter physiologischen Bedingungen in prokaryotischen, wie z. B. bakteriellen Zellsystemen, in eukaryotischen Zellen, wie z. B. Hefezellen oder menschlichen Zellen, oder in viralen Mikroorganismen oder bei der Wechselwirkung verschiedener dieser Zellsysteme untereinander, wie z. B. eine Wechselwirkung viraler Proteine mit eukaryotischen Proteinen, abläuft. Durch geeignete Wahl des Testsystems, insbesondere der zu transformierenden Wirtszellen, kann die Protein-Protein-Wechselwirkung unter möglichst physiologischen Bedingungen nachgeahmt werden.

Es sind unterschiedliche Arten von Protein-Protein-Wechselwirkungen anwendbar. Ein erster Typ betrifft Wechselwirkungen, die nur dann zustande kommen, wenn ein Effektor im Analyten anwesend ist. Ein positiver Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung ist somit gleichbedeutend mit einem positiven Effektor-Nachweis. Ein zweiter Typ betrifft Wechselwirkungen, die in Gegenwart eines Effektors unterbunden werden. Ein positiver Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung ist dann gleichbedeutend mit einem negativen Effektor-Nachweis.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise so durchgeführt, daß man ein geeignetes prokaryotisches oder eukaryotisches Wirtszellsystem mit einer ersten und einer zweiten Nukleinsäure-Sequenz transformiert, wobei die erste Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid A₁A₂ kodiert, welches die Transkriptions-Aktivierungsdomäne A₁ des Transkriptionsfaktors, wie z. B. Gal4, und die Polypeptid-Domäne A₂ umfaßt; und die zweite Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid B₁B₂ kodiert, welches die DNA-Bindungsdomäne B₁ eines Transkriptionsfaktors, wie z. B. GAL4, und die Polypeptid-Domäne B₂ umfaßt.

Der durch Wechselwirkung die Hybridprotein-Domänen A₂ und B₂ induzierte "funktionelle Transkriptionsaktivator-komplex" (A₁A₂/B₁B₂) entspricht hinsichtlich seiner Funktion im wesentlichen dem nativen Transkriptionsaktivator, von dem die Hybridprotein-Domänen A₁ und B₁ abgeleitet sind. Ebenfalls anwendbar sind funktionelle Äquivalente dieser Domänen, die man durch Aminosäure-Addition, -Deletion und/oder -Substitution unter Beibehaltung der charakteristischen Eigenschaften, wie Bindungsspezifität und Aktivierungsspezifität, gentechnisch oder in anderer Weise, herstellen kann.

Der erfindungsgemäß zu untersuchende Analyt ist vorzugsweise ein Gemisch von Substanzen, wobei man vermutet, daß wenigstens eine dieser Substanz einen positiven oder negativen Einfluß auf die vorgegebene Protein-Protein-Wechselwirkung ausübt. Insbesondere bevorzugt ist diese wirksame Substanz eine niedermolekulare anorganische, vorzugsweise organische Verbindung.

Der erfindungsgemäß untersuchte Analyt ist beispielsweise ausgewählt unter Körperflüssigkeitsproben, wie z. B. Gesamtblut, Muttermilch, Liquor, Speichel und Urin. Außerdem sind mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Extrakte oder Homogenate prokariotischer oder eukariotischer Zellen, wie z. B. bakterielle Homogenate, Homogenate aus Pflanzenzellen oder Homogenate aus niederen Eukaryoten, wie zum Beispiel Hefen, oder höheren Eukaryoten, wie zum Beispiel tierischen oder menschlichen Zellen untersuchbar. Bevor man die oben beschriebenen Analyten im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzt, kann es von Vorteil sein, höhermolekulare Komponenten, wie z. B. Zellfragmente, Organellen, oder Makromoleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren, abzutrennen.

Erfindungsgemäß untersuchbar sind ebenfalls umweltanalytische Proben, wie z. B. Wasser-, Luft- und Bodenproben, Rückstände aus Industrieanlagen, wie z. B. flüssiger oder fester Sondermüll, Filterstäube aus Rauchgasfilteranlagen. Außerdem sind erfindungsgemäß analysierbar Lebensmittelproben. Auch für die Untersuchung von Bodenproben, Rückständen aus Industrieanlagen sowie Lebensmittelproben ist es zweckmäßig, vor der Untersuchung einen geeigneten Extrakt herzustellen.

Schließlich besteht die Möglichkeit mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens Reaktionsgemische chemischer Synthesen, gegebenenfalls nach geeigneter Aufbereitung, wie z. B. Austausch von Lösungsmittel, Aufkonzentrieren oder Verdünnen, auf Effektorfunktion zu untersuchen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sind insbesondere Effektoren zellphysiologischer Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachweisbar, die in oder zwischen eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen, in Viruspartikeln oder zwischen Viruspartikeln und eukaryotischen Zellen ablaufen. Bei dem Effektor dieser Wechselwirkung kann es sich prinzipiell um eine wohl charakterisierte, bekannte Substanz oder um eine bisher in der Fachwelt nicht beschriebene Substanz handeln.

Als Beispiel für einen Effektor der einen zellphysiologischen Prozeß beeinflußt, welcher in eukaryotischen Zellen abläuft, kann 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) genannt werden. Das zelluläre Dioxin-Rezeptor-System stellt ein typisches Beispiel für eine Signal-kontrollierte Dimerisierung von basischen Helix-Loup-Helix (bHLH)-Faktoren dar. Der Ablauf der durch Dioxin vermittelten zellulären Signaltransduktion läßt sich folgendermaßen zusammenfassen: Vor der Bindung eines Dioxinmoleküls setzt sich das zytosolische Rezeptormolekül aus drei Untereinheiten zusammen: dem Dioxin-bindenden Ah-Rezeptor und zwei Molekülen des 90 kDa-Hitzeschockproteins HSP90. Den HSP90-Untereinheiten kommt dabei die Funktion zu, den Ah-Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden in einem inaktiven Zustand zu halten. Nach Bindung eines Dioxin-Moleküls an den Ah-Rezeptor dissoziieren die beiden HSP90-Moleküle vom Ah-Rezeptor ab, wodurch dieser aktiviert und zur Bindung an das sogenannte Arnt-Protein befähigt wird. Der so gebildete Dioxin-beladene Komplex ist dann zur Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern befähigt. Wie die Deletionsversuche zeigten, erfolgt die Proteindimerisierung über Wechselwirkung der beiden basischen Helix-Loup-Helix-Domänen im Ah-Rezeptor und im Arnt-Protein. Der Dioxin-beladene heterodimäre Rezeptorkomplex erkennt eine spezifische DNA-Sequenz, nämlich das sogenannte Xenobiotic Responsible Element (XRE). Die Bindung an das XRE führt zur Induktion einer Reihe von Zielgenen, u. a. des Gens für das Enzym Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) das am Metabolismus polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe beteiligt ist. Die durch die Metabolisierung polychlorierten polycyclischen Aromate, wie TCDD, ausgelösten Pathomechanismen, die z. B. zu Immunsuppression oder Tumorpromotion führen können, sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Es bietet sich nunmehr an, ein Two-Hybrid-Testsystem des oben beschriebenen allgemeinen Typs zu etablieren, worin man als erste Hybridproteindomäne A₂ den Ah-Rezeptor oder ein Bindungsfragment davon verwendet und als zweite Hybridproteindomäne B₂ entweder HSP 90 oder das Arnt-Protein oder ein bindendes Fragment eines der beiden Faktoren verwendet. Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen des Ah-Rezeptors, des HSP 90 sowie des Arnt-Proteins sind aus dem Stand der Technik bekannt, so daß die zur Durchführung des Tests erforderlichen Nukleinsäuresequenzen für die Herstellung der beiden Polypeptid-Hybride A₁A₂ und B₁B₂ leicht zur Verfügung gestellt werden können.

Für den Dioxinnachweis mit Hilfe der Two-Hybrid-Technik sind somit grundsätzlich zwei verschiedene Testsysteme denkbar. Im ersten Fall, das heißt bei Verwendung von HSP 90 und dem Ah-Rezeptor als Bindungspartner, wird durch die Bindung des Dioxin-Moleküls an den Ah-Rezeptor eine Protein-Protein-Wechselwirkung aufgehoben, was zur Folge hat, daß im Two-Hybrid-Test die Expression des Reporter-Gens unterbunden wird. Im zweiten Fall, das heißt bei Verwendung von Arnt-Protein und Ah-Rezeptor als Bindungspartner, wird durch die Bindung des Dioxinmoleküls an den Ah-Rezeptor eine Protein-Protein-Wechselwirkung aufgebaut, so daß im Two-Hybrid-Test die Expression eines Reporter-Gens nachgewiesen werden kann. Für die Durchführung des Dioxinnachweises bietet es sich an, auf Two-Hybrid-Testsysteme zurückzugreifen, welche für Protein-Protein-Bindungstests bereits etabliert wurden. So wird beispielsweise unter der Handelsbezeichnung MATCHMAKER Two-Hybrid-System von der Firma Clontech Laboratories Inc., Paolo Alto, USA, ein geeignetes Testsystem vertrieben. Auf die Angaben der Herstellerfirma, insbesondere auf das dem vertriebenen Testsystem beigelegte Versuchsprotokoll wird hiermit voll inhaltlich Bezug genommen.

Die Durchführung des Dioxinnachweises unter Verwendung des MATCHMAKER-Systems läßt sich wie folgt zusammenfassen: Das System umfaßt zwei verschiedene Expressionsvektoren (pGBT9 und pGAD424), welche Gene für die DNA-Bindungsdomäne (pGBT9) bzw. für die Aktivierungsdomäne (pGAD424) des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 tragen.

Der pGBT-Vektor wird zur Herstellung einer ersten Nukleinsäuresequenz verwendet, welche für ein Hybrid aus Gal4-DNA-Bindungsdomäne und Arnt-Protein besteht. Um diesen Hybridvektor zu konstruieren wird eine PCR (Polymerase Chain Reaction) mit den spezifischen Oligonukleotiden H3 und H4 folgender Sequenz:

H3: 5'CGGGATCCCCGAAATGACATCAGATGT (SEQ ID NO:3)
H4: 5'CGGGATCCACCTGCTGGGCAGAAAAG (SEQ ID NO:4)

mit der Arnt-cDNA als Matrix durchgeführt. Die spezifischen Primer erlauben Amplifikation des Arnt-Leserasters mit BamHI-Schnittstellen an dessen 5'- und 3'-Ende. Über die BamHI-Schnittstellen erfolgt die Ligation mit dem BamHI-behandelten pGBT9-Vektor.

Der pGAD424-Expressionsvektor des Matchmaker-Systems wird verwendet zur Herstellung einer zweiten Nucleinsäuresequenz, welche für ein Hybrid aus GAL4-Aktivierungsdomäne und dem Ah-Rezeptor dient. Der Leseraster des Ah-Rezeptors wird ausgehend von der Ah-cDNA mit Hilfe der spezifischen Oligonukleotide H1 und H2

H1: 5'AGGTCGACACTCTGCACCTTGCTTAGGAAT (SEQ ID NO:1)

H2: 5'AGGTCGACTTATGAGCAGCGGCCCAACAT (SEQ ID NO:2)

durch PCR amplifiziert. Diese Oligonucleotide versehen den Leseraster des Ah-Rezeptor mit Sall-Schnittstellen. Die auf diese Weise modifizierte Ah-Sequenz kann mit dem Sall-geschnittenen pGAD424-Vektor ligiert werden.

Die beiden auf diese Weise hergestellten Hybridvektoren pGBT9-Arnt und pGAD424-Ah werden zunächst in E. coli transformiert, vermehrt und gereinigt. Zeigen die isolierten Plasmide die gewünschten Konstrukte, werden pGBT9-Arnt und pGAD424-Ah in SFY526-Hefewirtszellen cotransformiert. Ist Dioxin im Wachstumsmedium anwesend, so ist eine Dimerisierung der beiden exprimierten Fusionsproteine die Folge. Die Dimerisierung der beiden GAL4-Domänen in den beiden Hybrid-Proteine führt zur Aktivierung der Transkription des Reportergens β -Galactosidase, dessen Bildung in üblicher Weise mittels Farbreaktion nachgewiesen wird. Die Nachweisempfindlichkeit für 2,3,7,8-TCDD liegt pro Ansatz im unteren Femtomol- bis oberem Atomol-Bereich und somit im Bereich der Nachweisgrenze der derzeit auf dem Markt erhältlichen empfindlichsten Massenspektrometer.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein Nachweisverfahren für Effektoren viraler Protein-Protein-Wechselwirkungen bereitgestellt. Dieses kann in völliger Analogie zu dem oben beschriebenen Dioxintest durchgeführt werden. Insbesondere werden gemäß dieser Ausführungsform Wechselwirkungen zwischen den Poliovirus-Capsidproteinen VP1 und VP3 sowie zwischen zwei p18-Capsidproteinen bzw. zwei p24-Capsidproteinen aus HIV-1 getestet. Beispiele für die Zusammensetzung in einem die erfindungsgemäßen Verfahren zum Nachweis viraler Protein-Protein-Wechselwirkungen anwendbarer Hybrid-Konstrukte A₁A₂ und B₁B₂ sind in folgender Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

Domäne	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂
Poliovirus	GAL4-BD	VP1	GAL4-AD	VP3
HIV 1	GAL4-BD	p18	GAL4-AD	p18
HIV 1	GAL4-BD	p24	GAL4-AD	p24

A₁ = DNA-Bindungsdomäne

A₂ = erstes virales Zielprotein

B₁ = Aktivator-domäne

B₂ = zweites virales Zielprotein

BD = Bindungsdomäne

AD = Aktivator-domäne

VP1 und VP3 können in den obengenannten Hybriden auch gegeneinander vertauscht sein.

Wie oben für den Dioxin-Test beschrieben, können die kodierenden und mit geeigneten Restriktionsschnittstellen versehenen DNA-Sequenzen für die viralen Hybridproteinkomponenten A₂ und B₂ hergestellt und in die oben beschriebenen Vektoren pGBT9 bzw. pGAD424 inseriert werden. Die Durchführung des Two-Hybrid-Tests zum Nachweis eines Effektors der viralen Protein-Protein-Wechselwirkung erfolgt dann in Analogie zum oben beschriebenen Dioxin-Test. Dieses Testsystem ist auch auf alle anderen Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung viraler Proteine übertragbar.

Viren, welche neben dem Proteincapsid zusätzlich über einen Envelope mit Glykoproteinen verfügen, können ebenfalls als Grundlage für ein erfindungsgemäßes Verfahren verwendet werden. Die Glykoproteine des Envelopes wechselwirken bekanntlich mit den Capsidproteinen. Diese Wechselwirkung ist notwendig, um das Virus mit der Envelope-Struktur auszustatten und gleichzeitig aus der Zelle auszuschleusen. So zeigt beispielsweise der Semliki-Forest-Virus zwei Spike-Glykoproteine E1 und E2, die, wie viele andere virale Hüll-Glykoproteine,

aus drei Domänen bestehen: einer externen, einer Transmembran- und einer internen Domäne. Die interne, C-terminale Domäne tritt in Wechselwirkung mit den Capsid-Proteinen. Ein Two-Hybrid-Test zum Nachweis von Effektoren dieser Wechselwirkung kann in der Weise etabliert werden, daß man die kodierende Sequenz für das Capsid-Protein und das Envelope-Glykoprotein, oder bevorzugt die DNA-Sequenz wechselwirkender Fragmente dieser beiden Proteine in die oben beschriebenen Vektoren inseriert und die auf den Vektoren enthaltene genetische Information in Gegenwart eines Analyten exprimiert. Ein Two-Hybrid Verfahren zum Nachweis von Effektoren der Wechselwirkung zwischen viralen Capsiden und Envelope-Proteinen stellt somit eine weitere bevorzugte Ausführungsform dar.

Für den Fachmann wird aus obigen Ausführungen ersichtlich, daß die vorliegende Erfindung nicht auf die oben beschriebenen konkreten Ausführungsformen und die beiliegenden Beispiele beschränkt ist. Vielmehr können unter Anwendung des erfindungsgemäßen Testprinzips weitere Testsysteme etabliert werden, welche auf definierten Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung eukaryotischer, prokaryotischer, und/oder viraler Proteine beruhen. Die Erfindung ist außerdem nicht auf die Verwendung der oben beschriebenen konkreten Vektoren und Wirtszellen beschränkt, vielmehr sind auch alle anderen vergleichbaren Testsysteme, wie z. B. die bisher in der Fachliteratur beschriebenen Expressionsvektoren und Wirtszellen anwendbar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung neuer Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man

- a) einen Analyten einem Nachweisverfahren gemäß obiger Definition unterzieht;
- b) bei positivem Nachweis einer Effektorfunktion in dem Analyten diese mit herkömmlichen präparativen Methoden, gegebenenfalls durch weitere Auftrennung des Analyten, eingrenzt und den Effektor, gegebenenfalls mit Hilfe des Nachweisverfahrens gemäß obiger Definition, oder in anderer Weise, wie z. B. durch Spektroskopie, Hochdrucksflüssigkeitschromatographie, Dünnschichtchromatographie, lokalisiert und mit herkömmlichen präparativen Methoden, wie z. B. Chromatographie, isoliert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nucleinsäuresequenzen, welche für Polypeptid-Hybride kodieren, die Polypeptid-Domänen gemäß obiger Definition enthalten. Bevorzugte Beispiele für Nucleinsäuresequenzen sind die für die Polypeptid-Hybride GAL4-Bindungsdomäne/Arnt und GAL4-Aktivierungsdomäne/Ah kodierenden Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein Analysenkit zur Durchführung eines der oben beschriebenen Nachweisverfahren. Der erfindungsgemäße Analysenkit ist dadurch gekennzeichnet, daß er in getrennten Kompartimenten

- a) einen ersten Transformationsvektor, kodierend für ein Polypeptid-Hybrid A₁A₂,
- b) einen zweiten Transformationsvektor, kodierend für ein Polypeptid-Hybrid B₁B₂ und gegebenenfalls
- c) eine Wirtszellkultur umfaßt, die die genetische Information für ein Reporter-Gen enthält, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche, nach Transformation der Wirtszelle mit dem ersten und dem zweiten Transformationsvektor der Transkriptions-Aktivator-Komplex A₁B₁ bindet, wenn die Hybridprotein-Domänen A₂ und B₂ in Gegenwart oder in Abwesenheit eines Effektors miteinander wechselwirken.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der folgenden Ausführungsbeispiele, welche die Etablierung eines Dioxin-Screening-Systems betreffen, näher erläutert.

Beispiel 1

Bereitstellung eines Testsystems für den genetischen Dioxin-Nachweis

1. Herstellung der Plasmidkonstrukte pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt

1.1 Allgemeine Vorschrift für die Durchführung der Polymerase Chain Reaction (PCR)

Es wurden folgende Primer synthetisiert:

Oligonucleotid H1: 5'AGGTCGACACTCTGCACCTTGCTTAGGAAT
 Oligonucleotid H2: 5'AGGTCGACTTATGAGCAGCGGCCAACAT
 Oligonucleotid H3: 5'CGGGATCCCCGAAATGACATCAGATGT
 Oligonucleotid H4: 5'CGGGATCCACCTGCTGGGCAGAAAAG

Das PCR-Protokoll wurde in etwas veränderter Form entsprechend den Angaben von Perkin-Elmer-Cetus (Protokoll für DNA Amplifikation) durchgeführt. Für die Amplifikation eines DNA-Fragments mit Hilfe der PCR wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Reagenz	Volumen in μ l	Konzentration
Taq-Polymerase	0,5	2,5 U
dNTP Mix: 1,25 mM je dNTP	16	0,2 mM
Primer 1	5	1 mM
Primer 2	5	1 mM
10*Taq-Puffer	10	1-fach
Plasmid-DNA	1	10 ng

Die Reaktion erfolgte in 100 μ l Endvolumen in siliconisierten, autoklavierten Reaktionsgefäßen. Die PCR wurde im DNA Thermocycler 1 min bei 95°C, 3 min bei 60°C und 2,5 min bei 72°C durchgeführt. Der 72°C-Schritt wurde pro Zyklus um 2 s verlängert. Insgesamt umfaßte die PCR 30 Zyklen. Die PCR wurde mit einem "Hot start" (zu Beginn 5 min 95°C) gestartet und nach 10 min bei 72°C beendet.

1.2 Synthese der Plasmidkonstrukte pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt

1.2.1 Materialien

Die Plasmide pGAD424 und pGBT9 (Fig. 1 (A) und (B)) sind von der Firma Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA erhältlich. Ah-cDNA und Arnt-cDNA können in herkömmlicher Weise aus Ah- und Arnt-Protein exprimierenden Zellen isoliert werden.

Die cDNA Klonierung sowie DNA- und Aminosäuresequenz von murinen Ah-Protein werden beispielsweise beschrieben von Ema, M. et al., in Biochem. Biophys. Res. Communications (1992), Bd. 184, 246—253, auf dessen Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Das murine Ah-Protein stellt ein Polypeptid aus 805 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 90380 Dalton dar.

Die cDNA Klonierung des humanen Arnt-Proteins wird beispielsweise beschrieben von Hoffman, E.C. et al. in Science (1991), Bd. 252, 954—958, auf dessen Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Das humane Arnt Protein umfaßt 789 Aminosäuren und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 86637 Dalton.

Da die kodierenden DNA-Sequenzen außerdem aus dem Stand der Technik bekannt sind, können die zur Durchführung der folgenden Beispiele erforderlichen DNA-Moleküle auch auf synthetischem Weg bereitgestellt werden.

1.2.2 Allgemeine Vorschrift für Restriktionsverdau und Ligation zur Herstellung der Plasmidkonstrukte

Zu ca. 2 mg DNA in bidestilliertem Wasser wurden 2 ml Restriktionsenzym-puffer (10 \times) und 10—20 U der betreffenden Restriktionsenzyme gegeben, mit bidestilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt, vorsichtig gemischt und bei 37°C 1—2 Stunden inkubiert. Die entsprechend behandelte DNA wurde auf einem 0,8% Agarose-TBE Gel aufgetrennt und mit dem QIAEX-Gel-Extraction-Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die Ligation der isolierten DNA-Fragmente erfolgte in 1 \times Ligasepuffer in einem Volumen von maximal 20 μ l mit 1 U T4-Ligase bei 16°C über Nacht. In der Regel lagen Vektor und Insert in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 3 vor.

1.2.3 Herstellung von pGAD424-Ah

Mit Hilfe der PCR-Methode wurde unter Verwendung der spezifischen Oligonucleotide H1 und H2, ausgehend von der Ah-cDNA-Matrix, die codierende Sequenz des Ah-Rezeptors amplifiziert. Die synthetischen Oligonucleotide wurden so konstruiert, daß in das amplifizierte Ah-Fragment am 3'- und 5'-Ende Sall Schnittstellen eingeführt wurden. Das gereinigte PCR-Ah-Fragment wurde einem Sall-Restriktionsverdau unterworfen und in den ebenfalls mit Sall geschnittenen pGAD424-Vektor ligiert (Fig. 2(B)). Die nach Transformation in den E. coli Stamm MC4lrF' erhaltenen Klone (Selektion auf Amp-Resistenz) wurden hinsichtlich ihrer Plasmide untersucht. Anhand eines EcoRI Restriktionsverdau konnte bestimmt werden, welche Bakterienklone das gewünschte Konstrukt pGAD424-Ah enthielten. Der entsprechende Bakterienklon wurde vermehrt und die Plasmid-pGAD424-Ah-DNA isoliert. Für die Plasmid-Isolierung aus transformierten E.coli Zellen wurde der QIAGEN-Plasmid-Kit in Kombination mit QIAGEN-Tip-200 Säulen verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Plasmidisolierung wurde eine 150 ml Übernachtskultur

der transformierten E.coli Zellen verwendet. Die Plasmidausbeute einer Isolierung lag für Plasmid pGAD424-Ah zwischen 0,5 und 1 mg/ml.

1.2.4 Herstellung von pGBT9-Arnt

Mit Hilfe der PCR-Methode wurde unter Verwendung der spezifischen Oligonucleotide H3 und H4, ausgehend von der Arnt-cDNA-Matrix (SEQ ID NO:5), die codierende Sequenz des Arnt-Rezeptors (SEQ ID NO:6) amplifiziert. Die synthetischen Oligonucleotide wurden so konstruiert, daß in das amplifizierte Arnt-Fragment am 3'- und 5'-Ende BamHI Schnittstellen eingeführt wurden. Das gereinigte PCR-Arnt-Fragment wurden einem BamHI-Restriktionsverdau unterworfen und in den ebenfalls mit BamHI geschnittenen pGBT9-Vektor ligiert (Fig. 2(A)). Die nach Transformation in den E. coli Stamm MC41rF⁺ erhaltenen Klone (Selektion auf Amp-Resistenz) wurden hinsichtlich ihrer Plasmide untersucht. Anhand eines EcoRI Restriktionsverdaus konnte bestimmt werden, welche Bakterienklone das gewünschte Konstrukt pGBT9-Arnt enthielten. Der entsprechende Bakterienklon wurde vermehrt und die Plasmid-pGBT9-Arnt-DNA isoliert. Für die Plasmid-Isolierung aus transformierten E.coli Zellen wurde der QIAGEN-Plasmid-Kit in Kombination mit QIAGEN-Tip-200 Säulen verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Plasmidisolierung wurde eine 150 ml Übernachtskultur der transformierten E.coli Zellen verwendet. Die Plasmidausbeute einer Isolierung lag für pGBT9-Arnt zwischen 0,5 und 1 mg/ml.

1.3. Transformation der Plasmide pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt in dem Hefestamm SFY526

1.3.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

20 ml YPD Medium wurden mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die 20 ml Übernachtskultur sollte nach dieser Zeit die stationäre Phase erreicht haben, d. h. eine OD > 1,5 zeigen. Die Übernachtskultur wurde verwendet, um 300 ml frisches YPD Medium anzupflanzen; diese 300 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2—0,3 wurde 3 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in 50 ml sterilem, bidestilliertem Wasser zweimal gewaschen und in 1,5 ml frischem, sterilem 1 × TE/LiAc-Puffer (unmittelbar vor Verwendung hergestellt aus 10 × TE-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) und 10 × LiAc-Puffer (1 M Lithiumacetat, pH 7,5)) resuspendiert. Die kompetenten Hefezellen wurden sofort für die Transformation verwendet.

1.3.2 Transformation kompetenter Hefezellen

Zu 0,1 µg Plasmid-DNA und 100 µg Carrier DNA ("herring testes carrier DNA") wurden 0,1 ml kompetente Hefezellen pipettiert sowie 0,6 ml PEG/LiAc Lösung (40% PEG 4000, 1 × TE, 1 × LiAc, frisch hergestellt). Der Ansatz wurde gut gemischt und bei 30°C 30 min geschüttelt. Nach der Zugabe von 70 µl DMSO folgte ein 15 min Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und das Pellet in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert. 0,25 ml der transformierten Zellen wurden auf SD-Platten (-Leu, -Trp) ausplattiert und die Platten 2—4 Tage bei 30°C inkubiert, bis sich die ersten Kolonien zeigten.

1.3.3 Cotransformationen

Zusätzlich zur Cotransformation mit den Plasmiden pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt wurden als negative bzw. positive Kontrollen folgende Plasmidkombinationen ebenfalls in SFY526 transformiert.

- a) pGAD424/pGBT9-Arnt
- b) pGAD424-Ah/pGBT9
- c) pLAM 5'/pTD1
- d) pLAM 5'/pCL1

pLAM 5' kodiert für ein Hybrid aus GAL4 Bindungsdomäne und humanem Lamin C;
pTD1 kodiert für ein Hybrid aus GAL4 Aktivatorodomäne und SV40 large T-Antigen;
pCL1 kodiert für ein full-length GAL4.

Die Plasmide pLAM5', pTD1 und pCL1 sind ebenfalls von der Fa. Clontech Laboratories Inc. erhältlich.

1.4 Dioxin-Nachweis durch Bestimmung der Interaktion des Gal4-DNA-Bindungsdomäne/Arnt-Fusionsproteins (kodiert von pGBT9-Arnt) mit dem Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne/Ah-Fusionsprotein (kodiert von pGAD424-Ah)

1.4.1 Nachweis auf Agarplatten

Die erfolgreich transformierten SFY 526 Hefen wurden auf SSX-Indikator-Platten ausgestrichen.
Die SSX-Indikator-Platten (Chien et al. 1991) weisen folgende Zusammensetzung auf:

Yeast-Nitrogen-Base: 6,7 g
Agar: 14 g
1 M NaP_i pH 7,0: 100 ml
10 × Aminosäuren (-Leu-Trp): 100 ml

20% Sucrose: 100 ml

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal): 40 mg

H₂O bidest.: ad 1 l

Die SSX Platten enthalten die Substanz X-Gal, welche nach Interaktion der Fusionsproteine zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Während die Kontroll-Hefen (pLAM5'/pcL1) nach Wachstum (o/n) auf SSX Platten eine eindeutige Blaufärbung zeigten, war dies bei den anderen Plasmidkombinationen nicht der Fall. 5

Die pGAD424-Ah/pGBT9-Arnt SFY5426 Hefen ließen nach Auflegen von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) enthaltenden Pads (TCDD wurde in 10% DMSO auf die Pads aufgetragen) auf die SSX-Platten eine spezifische, konzentrationsabhängige Blaufärbung im Bereich der Kontaktflächen erkennen, nicht jedoch die Kontroll-Hefen (pGAD424/pGBT9-Arnt; pGAD424-Ah/pGBT9, pLAM 5'/pTD1). Die Nachweisgrenze für 2,3,7,8-TCDD lag im Bereich von 0,1 ng pro Pad. 10

1.4.2 Nachweis in Flüssigkultur

Die Effektorwirkung des Dioxinliganden auf die Interaktion von Ah- und Arnt-Protein konnte auch mit Hilfe des β -Galaktosidase-Aktivitätstests in Flüssigkultur nachgewiesen werden. Folgendes Protokoll wurde verwendet: 15

Der mit pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt cotransformierte Hefestamm SFY526 wurde über Nacht bei 30°C in SD-Medium -Leu, -Trp kultiviert. Als Kontrolle dienten die unter 1.3.3 genannten Cotransformationen a) bis d).

Jeweils 2 ml der Übernachtskultur wurden in 8 ml YPD Flüssigmedium (20 g/l Difco Pepton, 10 g/l Hefeextrakt) pipettiert und 3–5 Stunden bei 30°C geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5–0,7 aufwies. 1,5 ml der Kultur wurden im folgenden mit verschiedenen Dioxinmengen bei 30°C 3 Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert in 1,5 ml Z-Puffer (16,1 g/l Na₂HPO₄ · 7H₂O, 5,5 g/l NaH₂PO₄ · H₂O, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l MgSO₄ · 7H₂O, pH 7,0) gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 0,3 ml Z-Puffer Endvolumen aufgenommen. 0,1 ml dieser Zellsuspension wurden für den β -Galaktosidase-Aktivitätstest verwendet. Die Zellsuspension wurde zu diesem Zweck in Trockeneis schockgefroren und sofort auf 37°C wieder aufgetaut. Zu der Zellsuspension wurden anschließend 0,7 ml Z-Puffer pipettiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,16 ml ONPG-Lösung (4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in Z-Puffer) gestartet. Die Freisetzung von ONP ist im Bereich von 50 bis 500 fg 2,3,7,8-TCDD konzentrationsabhängig. Der Flüssigtest erwies sich als sehr sensitiv für den Nachweis des Dioxinliganden. In den Kontrollen, die ohne Dioxin inkubiert worden waren (nur mit dem Lösungsmittel 5% DMSO), war keine Aktivität des Reporterproteins β -Gal zu beobachten. 20 25 30

Bezüglich weiterer Details zur Durchführung des Two-Hybrid-Tests wird auf die Produktbeschreibung zum MATCHMAKER Two-Hybrid System der Firma Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA verwiesen. 35

Beispiel 2

Screening von Bodenproben auf Dioxinkontamination

3 Bodenproben, deren Dioxingehalt bereits zuvor mittels GC/MS ermittelt worden war, wurden einem Screeningtest nach dem beschriebenen Verfahren unterworfen. Probe 1 hatte einen PCDD/PCDF-Gehalt von 25 ng I-TEQ/kg, Probe 2 von 457 ng I-TEQ/kg und Probe 3 von 1950 ng I-TEQ/kg. Jeweils 1 g der Probe wurde mit 2 ml Benzol 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wurde mit 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure bei 70°C 10 min behandelt. Der klare Überstand wurde in ein Probengläschen mit 100 mg K₂CO₃ transferiert, geschüttelt und in ein weiteres Probengläschen überführt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und der "Rückstand" in 300 μ l Hexan aufgenommen. Die Probe wurde in 3 Aliquote aufgeteilt, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in den 3 Gläschen mit 10 μ l, 30 μ l und 100 μ l 5% DMSO in Wasser aufgenommen. 5 μ l der jeweiligen Probe wurde in den oben unter 1.4.2 beschriebenen Test in Flüssigkultur eingeschleust. 40 45

Die erhaltenen Gelbfärbungen waren proportional zu den zuvor bestimmten I-TEQ-Werten. Allerdings wurde bei den beiden Proben mit der höchsten Konzentration ein Inhibitionseffekt beobachtet. In der Praxis ist deshalb eine noch stärkere Abstufung der Konzentrationen für die einzelnen Aliquote einer Probe erforderlich, damit man stets in einem Bereich bleibt, in dem keine Inhibition erfolgt. 50

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Hanspaul Hagenmaier
- (B) STRASSE: Liegnitzerstr. 8
- (C) ORT: Tuebingen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 72072

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweis fuer Effektoren intra- und/oder interzellulaerer Protein-Protein-Wechselwirkungen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AGGTCGACAC TCTGCACCTT GCTTAGGAAT

30

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

15

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches
Oligonukleotid"

25

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

35

AGGTCGACTT ATGAGCAGCG GCGCCAACAT

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

45

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches
Oligonucleotid"

55

60

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3.

CGGGATCCCC GAAATGACAT CAGATGT

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches
Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CGGGATCCAC CTGCTGGGCA GAAAAG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2616 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (F) GEWEBETYP: Liver
 (G) ZELLTYP: Hepatocyte
 (H) ZELLINIE: HepG2

5

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 1p36-q12

10

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: terminator
 (B) LAGE:2424..2426

15

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 (B) LAGE:1..56

20

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:57..2423

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

30

ATGGCGGCTC CTCCACTGG GGGGGGGGTG GCGCGGCGGC GGTGGCATCT GCGGCC 56

35

ATG GCG GCG ACT ACT GCC AAC CCC GAA ATG ACA TCA GAT GTA CCA TCA 104

Met Ala Ala Thr Thr Ala Asn Pro Glu Met Thr Ser Asp Val Pro Ser

1 5 10 15

40

CTG GGT CCA GCC ATT GCC TCT GGA AAC TCT GGA CCT GGA ATT CAA GGT 152

Leu Gly Pro Ala Ile Ala Ser Gly Asn Ser Gly Pro Gly Ile Gln Gly

20 25 30

45

GGA GGA GCC ATT GTC CAG AGG GCT ATT AAG CGG CGA CCA GGG CTG GAT 200

Gly Gly Ala Ile Val Gln Arg Ala Ile Lys Arg Arg Pro Gly Leu Asp

35 40 45

50

TTT GAT GAT GAT GGA GAA GGG AAC AGT AAA TTT TTG AGG TGT GAT GAT 248

55

60

65

Phe Asp Asp Asp Gly Glu Gly Asn Ser Lys Phe Leu Arg Cys Asp Asp
 50 55 60

5 GAT CAG ATG TCT AAC GAT AAG GAG CGG TTT GCC AGG TCG GAT GAT GAG 296
 Asp Gln Met Ser Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ala Arg Ser Asp Asp Glu
 65 70 75 80

10 CAG AGC TCT GCG GAT AAA GAG AGA CTT GCC AGG GAA AAT CAC AGT GAA 344
 Gln Ser Ser Ala Asp Lys Glu Arg Leu Ala Arg Glu Asn His Ser Glu
 85 90 95

15 ATT GAA CGG CGG CGA CGG AAC AAG ATG ACA GCC TAC ATC ACA GAA CTG 392
 Ile Glu Arg Arg Arg Arg Asn Lys Met Thr Ala Tyr Ile Thr Glu Leu
 100 105 110

20 TCA GAT ATG GTA CCC ACC TGT AGT GCC CTG GCT CGA AAA CCA GAC AAG 440
 Ser Asp Met Val Pro Thr Cys Ser Ala Leu Ala Arg Lys Pro Asp Lys
 115 120 125

25 CTA ACC ATC TTA CGC ATG GCA GTT TCT CAC ATG AAG TCC TTG CGG GGA 488
 Leu Thr Ile Leu Arg Met Ala Val Ser His Met Lys Ser Leu Arg Gly
 130 135 140

30 ACT GGC AAC ACA TCC ACT GAT GGC TCC TAT AAG CCG TCT TTC CTC ACT 536
 Thr Gly Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Tyr Lys Pro Ser Phe Leu Thr
 145 150 155 160

35 GAT CAG GAA CTG AAA CAT TTG ATC TTG GAG GCA GCA GAT GGC TTT CTG 584
 Asp Gln Glu Leu Lys His Leu Ile Leu Glu Ala Ala Asp Gly Phe Leu
 165 170 175

40 TTT ATT GTC TCA TGT GAG ACA GGC AGG GTG GTG TAT GTG TCT GAC TCC 632
 Phe Ile Val Ser Cys Glu Thr Gly Arg Val Val Tyr Val Ser Asp Ser
 180 185 190

45 GTG ACT CCT GTT TTG AAC CAG CCA CAG TCT GAA TGG TTT GGC AGC ACA 680
 Val Thr Pro Val Leu Asn Gln Pro Gln Ser Glu Trp Phe Gly Ser Thr
 195 200 205

DE 196 28 894 A1

CTC TAT GAT CAG GTG CAC CCA GAT GAT GTG GAT AAA CTT CGT GAG CAG	728	
Leu Tyr Asp Gln Val His Pro Asp Asp Val Asp Lys Leu Arg Glu Gln		
210 215 220		5
CTT TCC ACT TCA GAA AAT GCC CTG ACA GGG CGT ATC CTG GAT CTA AAG	776	
Leu Ser Thr Ser Glu Asn Ala Leu Thr Gly Arg Ile Leu Asp Leu Lys		
225 230 235 240		10
ACT GGA ACA GTG AAA AAG GAA GGT CAG CAG TCT TCC ATG AGA ATG TGT	824	
Thr Gly Thr Val Lys Lys Glu Gly Gln Gln Ser Ser Met Arg Met Cys		
245 250 255		15
ATG GGC TCA AGG AGA TCG TTT ATT TGC CGA ATG AGG TGT GGC AGT AGC	872	
Met Gly Ser Arg Arg Ser Phe Ile Cys Arg Met Arg Cys Gly Ser Ser		
260 265 270		20
TCT GTG GAC CCA GTT TCT GTG AAT AGG CTG AGC TTT GTG AGG AAC AGA	920	
Ser Val Asp Pro Val Ser Val Asn Arg Leu Ser Phe Val Arg Asn Arg		
275 280 285		25
TGC AGG AAT GGA CTT GGC TCT GTA AAG GAT GGG GAA CCT CAC TTC GTG	968	
Cys Arg Asn Gly Leu Gly Ser Val Lys Asp Gly Glu Pro His Phe Val		
290 295 300		30
GTG GTC CAC TGC ACA GGC TAC ATC AAG GCC TGG CCC CCA GCA GGT GTT	1016	
Val Val His Cys Thr Gly Tyr Ile Lys Ala Trp Pro Pro Ala Gly Val		
305 310 315 320		35
TCC CTC CCA GAT GAT GAC CCA GAG GCT GGC CAG GGA AGC AAG TTT TGC	1064	
Ser Leu Pro Asp Asp Asp Pro Glu Ala Gly Gln Gly Ser Lys Phe Cys		
325 330 335		40
CTA GTG GCC ATT GGC AGA TTG CAG GTA ACT AGT TCT CCC AAC TGT ACA	1112	
Leu Val Ala Ile Gly Arg Leu Gln Val Thr Ser Ser Pro Asn Cys Thr		
340 345 350		50
GAC ATG AGT AAT GTT TGT CAA CCA ACA GAG TTC ATC TCC CGA CAC AAC	1160	
Asp Met Ser Asn Val Cys Gln Pro Thr Glu Phe Ile Ser Arg His Asn		
355 360 365		55

60

65

	ATT GAG GGT ATC TTC ACT TTT GTG GAT CAC CGC TGT GTG GCT ACT GTT	1208
	Ile Glu Gly Ile Phe Thr Phe Val Asp His Arg Cys Val Ala Thr Val	
	370 375 380	
5		
	GGC TAC CAG CCA CAG GAA CTC TTA GGA AAG AAT ATT GTA GAA TTC TGT	1256
	Gly Tyr Gln Pro Gln Glu Leu Leu Gly Lys Asn Ile Val Glu Phe Cys	
10	385 390 395 400	
	CAT CCT GAA GAC CAG CAG CTT CTA AGA GAC AGC TTC CAA CAG GTA GTG	1304
	His Pro Glu Asp Gln Gln Leu Leu Arg Asp Ser Phe Gln Gln Val Val	
15	405 410 415	
	AAA TTA AAA GGC CAA GTG CTG TCT GTC ATG TTC CGG TTC CGG TCT AAG	1352
	Lys Leu Lys Gly Gln Val Leu Ser Val Met Phe Arg Phe Arg Ser Lys	
20	420 425 430	
	AAC CAA GAA TGG CTC TGG ATG AGA ACC AGC TCC TTT ACT TTC CAG AAC	1400
	Asn Gln Glu Trp Leu Trp Met Arg Thr Ser Ser Phe Thr Phe Gln Asn	
25	435 440 445	
	CCT TAC TCA GAT GAA ATT GAG TAC ATC ATC TGT ACC AAC ACC AAT GTG	1448
	Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Ile Cys Thr Asn Thr Asn Val	
30	450 455 460	
	AAG AAC TCT AGC CAA GAA CCA CGG CCT ACA CTC TCC AAC ACA ATC CAG	1496
	Lys Asn Ser Ser Gln Glu Pro Arg Pro Thr Leu Ser Asn Thr Ile Gln	
35	465 470 475 480	
	AGG CCA CAA CTA GGT CCC ACA GCT AAT TTA CCC CTG GAG ATG GGC TCA	1544
	Arg Pro Gln Leu Gly Pro Thr Ala Asn Leu Pro Leu Glu Met Gly Ser	
40	485 490 495	
	GGA CAG CTG GCA CCC AGG CAG CAG CAA CAG CAA ACA GAA TTG GAC ATG	1592
	Gly Gln Leu Ala Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Thr Glu Leu Asp Met	
45	500 505 510	
50		
55		
60		
65		

DE 196 28 894 A1

GTA CCA GGA AGA GAT GGA CTG GCC AGC TAC AAT CAT TCC CAG GTG GTT	1640	
Val Pro Gly Arg Asp Gly Leu Ala Ser Tyr Asn His Ser Gln Val Val		
515 520 525		5
CAG CCT GTG ACA ACC ACA GGA CCA GAA CAC AGC AAG CCC CTT GAG AAG	1688	
Gln Pro Val Thr Thr Thr Gly Pro Glu His Ser Lys Pro Leu Glu Lys		
530 535 540		10
TCA GAT GGT TTA TTT GCC CAG GAT AGA GAT CCA AGA TTT TCA GAA ATC	1736	
Ser Asp Gly Leu Phe Ala Gln Asp Arg Asp Pro Arg Phe Ser Glu Ile		
545 550 555 560		15
TAT CAC AAC ATC AAT GCG GAT CAG AGT AAA GGC ATC TCC TCC AGC ACT	1784	
Tyr His Asn Ile Asn Ala Asp Gln Ser Lys Gly Ile Ser Ser Ser Thr		
565 570 575		20
GTC CCT GCC ACC CAA CAG CTA TTC TCC CAG GGC AAC ACA TTC CCT CCT	1832	
Val Pro Ala Thr Gln Gln Leu Phe Ser Gln Gly Asn Thr Phe Pro Pro		
580 585 590		25
ACC CCC CGG CCG GCA GAG AAT TTC AGG AAT AGT GGC CTA GCC CCT CCT	1880	
Thr Pro Arg Pro Ala Glu Asn Phe Arg Asn Ser Gly Leu Ala Pro Pro		
595 600 605		30
GTA ACC ATT GTC CAG CCA TCA GCT TCT GCA GGA CAG ATG TTG GCC CAG	1928	
Val Thr Ile Val Gln Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Met Leu Ala Gln		
610 615 620		35
ATT TCC CGC CAC TCC AAC CCC ACC CAA GGA GCA ACC CCA ACT TGG ACC	1976	
Ile Ser Arg His Ser Asn Pro Thr Gln Gly Ala Thr Pro Thr Trp Thr		
625 630 635 640		40
CCT ACT ACC CGC TCA GGC TTT TCT GCC CAG CAG GTG GCT ACC CAG GCT	2024	
Pro Thr Thr Arg Ser Gly Phe Ser Ala Gln Gln Val Ala Thr Gln Ala		
645 650 655		45
ACT GCT AAG ACT CGT ACT TCC CAG TTT GGT GTG GGC AGC TTT CAG ACT	2072	
Thr Ala Lys Thr Arg Thr Ser Gln Phe Gly Val Gly Ser Phe Gln Thr		
660 665 670		50
		55
		60
		65

DE 196 28 894 A1

	CCA TCC TCC TTC AGC TCC ATG TCC CTC CCT GGT GCC CCA ACT GCA TCG	2120
	Pro Ser Ser Phe Ser Ser Met Ser Leu Pro Gly Ala Pro Thr Ala Ser	
	675 680 685	
5		
	CCT GGT GCT GCT GCC TAC CCT AGT CTC ACC AAT CGT GGA TCT AAC TTT	2168
	Pr Gly Ala Ala Ala Tyr Pro Ser Leu Thr Asn Arg Gly Ser Asn Phe	
10	690 695 700	
	GCT CCT GAG ACT GGA CAG ACT GCA GGA CAA TTC CAG ACA CGG ACA GCA	2216
	Ala Pro Glu Thr Gly Gln Thr Ala Gly Gln Phe Gln Thr Arg Thr Ala	
15	705 710 715 720	
	GAG GGT GTG GGT GTC TGG CCA CAG TGG CAG GGC CAG CAG CCT CAT CAT	2264
	Glu Gly Val Gly Val Trp Pro Gln Trp Gln Gly Gln Gln Pro His His	
20	725 730 735	
	CGT TCA AGT TCT AGT GAG CAA CAT GTT CAA CAA CCG CCA GCA CAG CAA	2312
	Arg Ser Ser Ser Ser Glu Gln His Val Gln Gln Pro Pro Ala Gln Gln	
25	740 745 750	
	CCT GGC CAG CCT GAG GTC TTC CAG GAG ATG CTG TCC ATG CTG GGA GAT	2360
	Pro Gly Gln Pro Glu Val Phe Gln Glu Met Leu Ser Met Leu Gly Asp	
30	755 760 765	
	CAG AGC AAC AGC TAC AAC AAT GAA GAA TTC CCT GAT CTA ACT ATG TTT	2408
	Gln Ser Asn Ser Tyr Asn Asn Glu Glu Phe Pro Asp Leu Thr Met Phe	
35	770 775 780	
	CCC CCC TTT TCA GAA TAGAACTATT GGGGTGAGGA TAAGGGGTGG GGGAGAAAAA	2463
	Pro Pro Phe Ser Glu	
40	785	
	ATCACTGTTT GTTTTTAAAA AGCAAATCTT TCTGTAAACA GAATAAAAGT TCCTCTCCCT	2523
45		
	TCCCTTCCCT CACCCCTGAC ATGTACCCCC TTTCCTTCT GGCTGTTCCC CTGCTCTGTT	2583
50		
	GCCTCCTAAG GTAACATTTA TAAAAA AAA	2616
55		
60		
65		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 789 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Asn	Pro	Glu	Met	Thr	Ser	Asp	Val	Pro	Ser	15
1					5				10					15		
Leu	Gly	Pro	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	Gly	20
			20					25					30			
Gly	Gly	Ala	Ile	Val	Gln	Arg	Ala	Ile	Lys	Arg	Arg	Pro	Gly	Leu	Asp.	25
		35					40					45				
Phe	Asp	Asp	Asp	Gly	Glu	Gly	Asn	Ser	Lys	Phe	Leu	Arg	Cys	Asp	Asp	30
	50					55					60					
Asp	Gln	Met	Ser	Asn	Asp	Lys	Glu	Arg	Phe	Ala	Arg	Ser	Asp	Asp	Glu	35
65					70				75					80		
Gln	Ser	Ser	Ala	Asp	Lys	Glu	Arg	Leu	Ala	Arg	Glu	Asn	His	Ser	Glu	40
			85						90				95			
Ile	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Asn	Lys	Met	Thr	Ala	Tyr	Ile	Thr	Glu	Leu	
			100				105					110				
Ser	Asp	Met	Val	Pro	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Ala	Arg	Lys	Pro	Asp	Lys	45
		115					120				125					
Leu	Thr	Ile	Leu	Arg	Met	Ala	Val	Ser	His	Met	Lys	Ser	Leu	Arg	Gly	50
		130				135					140					

DE 196 28 894 A1

	Thr	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Lys	Pro	Ser	Phe	Leu	Thr	
	145					150					155					160	
5	Asp	Gln	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Ile	Leu	Glu	Ala	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	
					165					170					175		
10	Phe	Ile	Val	Ser	Cys	Glu	Thr	Gly	Arg	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Asp	Ser	
					180					185					190		
15	Val	Thr	Pro	Val	Leu	Asn	Gln	Pro	Gln	Ser	Glu	Trp	Phe	Gly	Ser	Thr	
					195					200				205			
20	Leu	Tyr	Asp	Gln	Val	His	Pro	Asp	Asp	Val	Asp	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	
	210					215						220					
25	Leu	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Ala	Leu	Thr	Gly	Arg	Ile	Leu	Asp	Leu	Lys	
	225					230						235				240	
30	Thr	Gly	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Gly	Gln	Gln	Ser	Ser	Met	Arg	Met	Cys	
					245					250					255		
35	Met	Gly	Ser	Arg	Arg	Ser	Phe	Ile	Cys	Arg	Met	Arg	Cys	Gly	Ser	Ser	
					260					265					270		
40	Ser	Val	Asp	Pro	Val	Ser	Val	Asn	Arg	Leu	Ser	Phe	Val	Arg	Asn	Arg	
					275					280					285		
45	Cys	Arg	Asn	Gly	Leu	Gly	Ser	Val	Lys	Asp	Gly	Glu	Pro	His	Phe	Val	
	290					295						300					
50	Val	Val	His	Cys	Thr	Gly	Tyr	Ile	Lys	Ala	Trp	Pro	Pro	Ala	Gly	Val	
	305					310						315				320	
55	Ser	Leu	Pro	Asp	Asp	Asp	Pro	Glu	Ala	Gly	Gln	Gly	Ser	Lys	Phe	Cys	
					325					330					335		

60

65

DE 196 28 894 A1

Leu Val Ala Ile Gly Arg Leu Gln Val Thr Ser Ser Pro Asn Cys Thr	
340 345 350	
Asp Met Ser Asn Val Cys Gln Pro Thr Glu Phe Ile Ser Arg His Asn	5
355 360 365	
Ile Glu Gly Ile Phe Thr Phe Val Asp His Arg Cys Val Ala Thr Val	10
370 375 380	
Gly Tyr Gln Pro Gln Glu Leu Leu Gly Lys Asn Ile Val Glu Phe Cys	15
385 390 395 400	
His Pro Glu Asp Gln Gln Leu Leu Arg Asp Ser Phe Gln Gln Val Val	20
405 410 415	
Lys Leu Lys Gly Gln Val Leu Ser Val Met Phe Arg Phe Arg Ser Lys	25
420 425 430	
Asn Gln Glu Trp Leu Trp Met Arg Thr Ser Ser Phe Thr Phe Gln Asn	30
435 440 445	
Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Ile Cys Thr Asn Thr Asn Val	35
450 455 460	
Lys Asn Ser Ser Gln Glu Pro Arg Pro Thr Leu Ser Asn Thr Ile Gln	40
465 470 475 480	
Arg Pro Gln Leu Gly Pro Thr Ala Asn Leu Pro Leu Glu Met Gly Ser	45
485 490 495	
Gly Gln Leu Ala Pro Arg Gln Gln Gln Gln Thr Glu Leu Asp Met	50
500 505 510	
Val Pro Gly Arg Asp Gly Leu Ala Ser Tyr Asn His Ser Gln Val Val	55
515 520 525	
Gln Pro Val Thr Thr Thr Gly Pro Glu His Ser Lys Pro Leu Glu Lys	60
530 535 540	

65

Ser Asp Gly Leu Phe Ala Gln Asp Arg Asp Pro Arg Phe Ser Glu Ile
 545 550 555 560

5 Tyr His Asn Ile Asn Ala Asp Gln Ser Lys Gly Ile Ser Ser Ser Thr
 565 570 575

10 Val Pro Ala Thr Gln Gln Leu Phe Ser Gln Gly Asn Thr Phe Pro Pro
 580 585 590

15 Thr Pro Arg Pro Ala Glu Asn Phe Arg Asn Ser Gly Leu Ala Pro Pro
 595 600 605

20 Val Thr Ile Val Gln Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Met Leu Ala Gln
 610 615 620

25 Ile Ser Arg His Ser Asn Pro Thr Gln Gly Ala Thr Pro Thr Trp Thr
 625 630 635 640

30 Pro Thr Thr Arg Ser Gly Phe Ser Ala Gln Gln Val Ala Thr Gln Ala
 645 650 655

35 Thr Ala Lys Thr Arg Thr Ser Gln Phe Gly Val Gly Ser Phe Gln Thr
 660 665 670

40 Pro Ser Ser Phe Ser Ser Met Ser Leu Pro Gly Ala Pro Thr Ala Ser
 675 680 685

45 Pro Gly Ala Ala Ala Tyr Pro Ser Leu Thr Asn Arg Gly Ser Asn Phe
 690 695 700

50 Ala Pro Glu Thr Gly Gln Thr Ala Gly Gln Phe Gln Thr Arg Thr Ala
 705 710 715 720

55 Glu Gly Val Gly Val Trp Pro Gln Trp Gln Gly Gln Gln Pro His His
 725 730 735

60 Arg Ser Ser Ser Ser Glu Gln His Val Gln Gln Pro Pro Ala Gln Gln
 740 745 750

65

Pro Gly Gln Pro Glu Val Phe Gln Glu Met Leu Ser Met Leu Gly Asp
 755 760 765

Gln Ser Asn Ser Tyr Asn Asn Glu Glu Phe Pro Asp Leu Thr Met Phe
 770 775 780

Pro Pro Phe Ser Glu
 785

Patentansprüche

1. Nachweisverfahren für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man
 - a) in einer Wirtszelle in Gegenwart eines Analyten, in dem man die Effektorfunktion vermutet, zwei Polypeptid-Hybride A₁A₂ und B₁B₂ exprimiert, deren Domänen A₁ und B₁ zusammen einen funktionellen Transkriptionsaktivator-Komplex bilden, wenn die Domänen A₂ und B₂, welche die intra- und/oder interzelluläre Wechselwirkung imitieren, miteinander wechselwirken, wobei die Wechselwirkung zwischen den Polypeptiddomänen A₂ und B₂ nur bei Fehlen oder Vorliegen der Effektorfunktion in dem Analyten zu beobachten ist; und
 - b) auf Expression eines Reportergens analysiert, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche der funktionelle Transkriptionsaktivator-Komplex bindet, wobei Expression des Reportergen-Produkts auf Vorliegen oder Fehlen der Effektorfunktion im Analyten hinweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei man die Wirtszelle mit einer ersten und einer zweiten Nukleinsäure-Sequenz transformiert, wobei die erste Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid A₁A₂ kodiert, welches die Transkriptions-Aktivierungsdomäne A₁ des Transkriptionsaktivators und die Polypeptid-Domäne A₂ umfaßt; und die zweite Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid B₁B₂ kodiert, welches die DNA-Bindungsdomäne B₁ des Transkriptionsaktivators und die Polypeptid-Domäne B₂ umfaßt.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt ausgewählt ist unter Körperflüssigkeitsproben, umweltanalytischen Proben, Reaktionsgemischen chemischer Synthesen, Lebensmittelproben, Extrakten obiger Proben, und Extrakten oder Homogenaten prokaryotischer oder eukaryotischer menschlicher, tierischer oder pflanzlicher Zellen.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt ein Gemisch von Substanzen oder eine Einzelsubstanz umfaßt, für die man die Effektorfunktion vermutet.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Effektor zellphysiologische Wechselwirkungen eukaryotischer oder prokaryotischer Zellen oder virale Prozesse beeinflußt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Effektor ein Schadstoff, wie insbesondere Dioxin, ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Effektor den Zusammenbau von Viruspartikeln oder die Bindung von Viruspartikeln an zelluläre Rezeptoren beeinflußt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Wirtssystem ein prokaryotisches oder eukaryotisches Wirtssystem ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei als Wirtssystem ein Hefe-Wirtstamm, ausgewählt unter SFY526 und HF7c, verwendet wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Aktivierungs-Domäne A₁ abgeleitet ist vom Transkriptionsaktivator GAL4 aus Hefe oder VP16 aus Herpes Simplex virus.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die DNA-Bindungsdomäne B₁ abgeleitet ist vom Transkriptionsaktivator GAL4 aus Hefe oder LexA aus E. coli.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Reportergen ausgewählt ist unter lacZ aus E. coli oder HIS3 und LEU2 aus Hefe.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Hybrid A₁A₂-kodierende Nukleinsäure abgeleitet ist von Plasmid pGAD424.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Hybrid B₁B₂-kodierende Nukleinsäure abgeleitet ist von Plasmid pGBT9.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Polypeptid-Domäne A₂ ausgewählt ist unter dem Ah-Rezeptor oder einem funktionalen Äquivalent davon; und die Polypeptid-Domäne B₂ ausgewählt ist unter dem Arndt-Protein und HSP90 und den funktionalen Äquivalenten davon.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Polypeptid-Domänen A₂ und B₂ ausgewählt sind unter viralen Capsid-Proteinen und viralen Envelope-Glykoproteinen und den funktionalen Äquivalenten davon; wobei die Domänen so gewählt sind, daß sie eine intermolekulare Bindung eingehen können.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Kombinationen von A₂ und B₂ ausgewählt ist unter folgenden Polypeptid-Kombinationen VP1/VP3, VP3/VP1, p18/p18 und p24/p24.
18. Verfahren zur Isolierung eines Effektors intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man

a) einen Analyten einem Nachweisverfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 unterzieht;
b) bei positivem Nachweis einer Effektorfunktion in dem Analyten diese mit herkömmlichen präparativen Methoden, gegebenenfalls durch weitere Auftrennung des Analyten, eingrenzt und den Effektor gegebenenfalls mit Hilfe des Nachweisverfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 lokalisiert und dann mit herkömmlichen präparativen Methoden isoliert.

19. Nukleinsäure-Sequenz, kodierend für ein Polypeptid-Hybrid, das Polypeptid-Domänen gemäß der Definition in einem der Ansprüche 13 und 17 umfaßt.

20. Nukleinsäure-Sequenz kodierend für ein Polypeptid-Hybrid ausgewählt unter GAL4-Bindungsdomäne/Arnt und GAL4-Aktivierungsdomäne/Ah.

21. Analysen-Kit zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, umfassend in getrennten Kompartimenten

a) einen ersten Transformationsvektor, kodierend für eine Polypeptid-Hybrid A_1A_2 ,

b) einen zweiten Transformationsvektor, kodierend für eine Polypeptid-Hybrid B_1B_2 , und gegebenenfalls

c) eine Wirtszelle, enthaltend die genetische Information für ein Reportergen, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche, nach Transformation der Wirtszelle mit dem ersten und dem zweiten Transformationsvektor, der Transkriptionsaktivator-Komplex A_1B_1 bindet, wenn die Hybridprotein-Domänen A_2 und B_2 in Gegenwart oder Abwesenheit eines Effektors miteinander wechselwirken.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

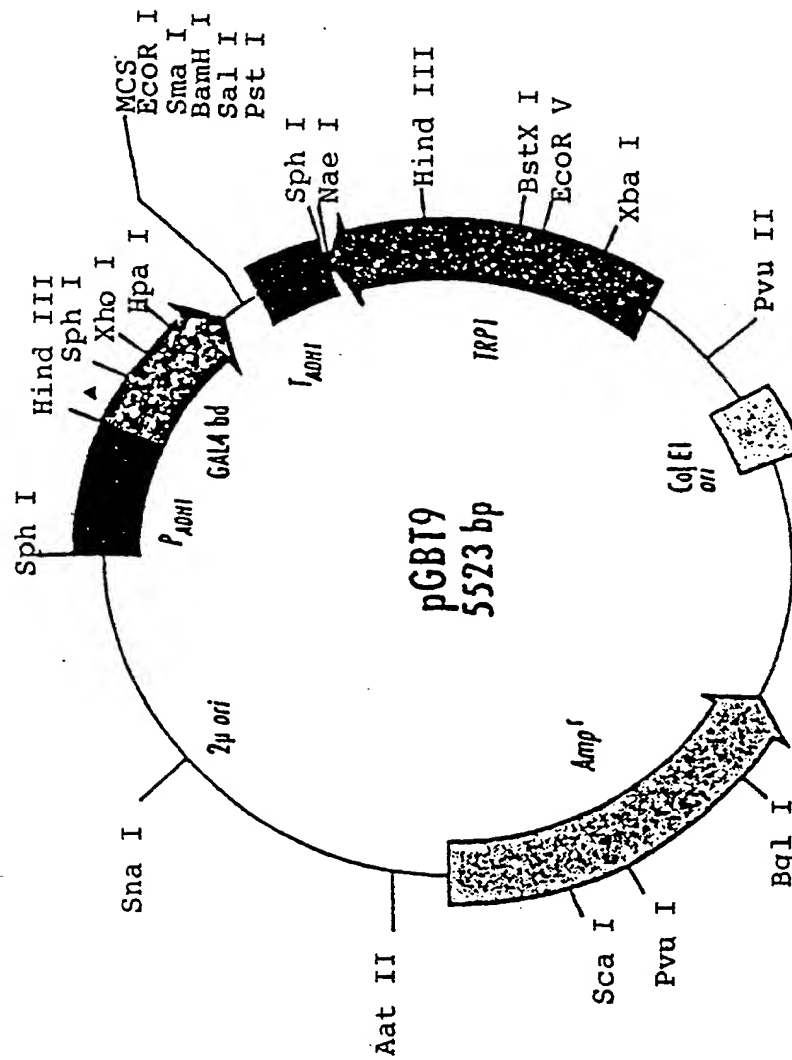


Fig. 1 (A)

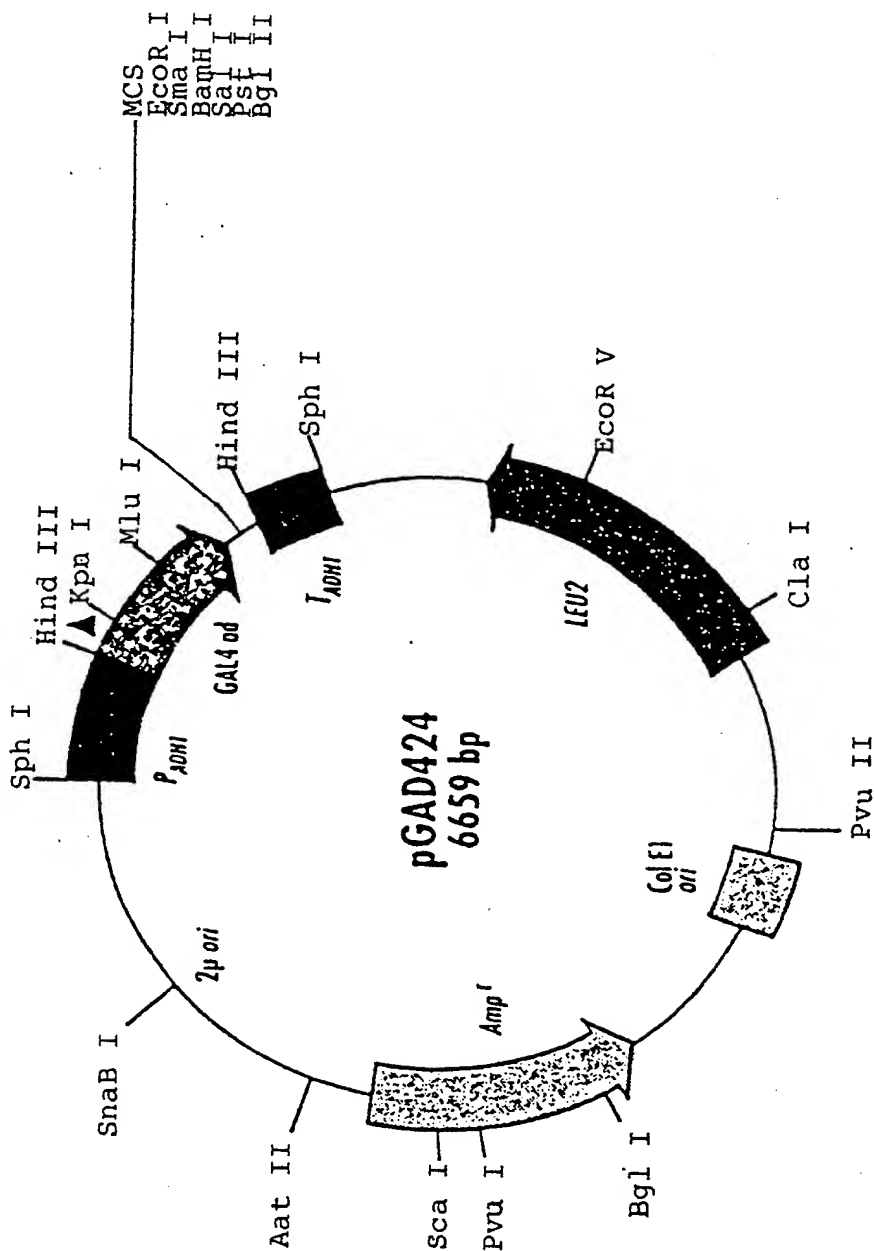


Fig. 1 (B)

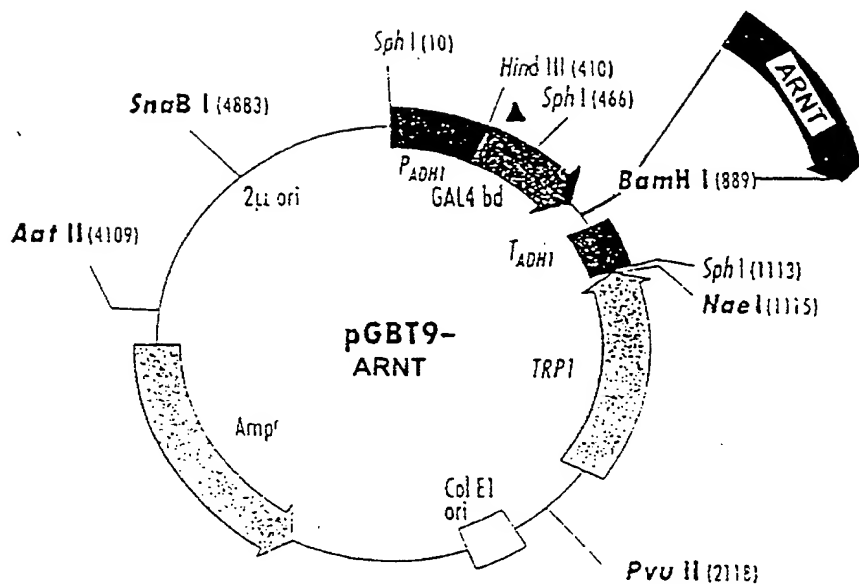


Fig. 2 (A)

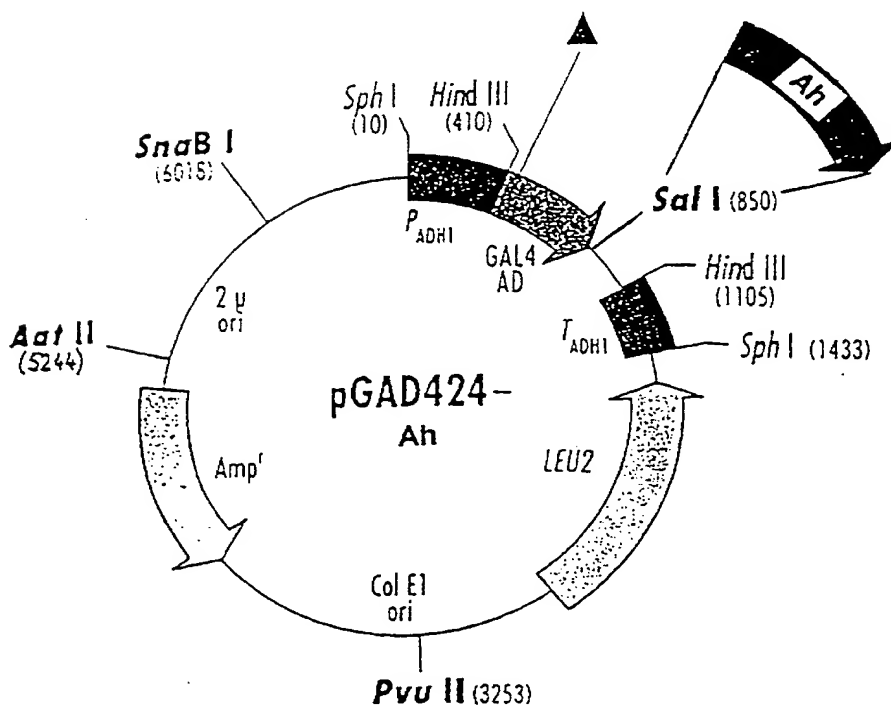


Fig. 2 (B)